

811

XP-002098914

- 1/1 - (C) WPI / DERWENT
AN - 83-810822 945!
PR - JP827046404 820325
TI - Pulmonary surfactants for treating infantile
respiration deficiency - comprise protein-free powders
mainly comprising phospholipid(s)
IW - PULMONARY SURFACTANT TREAT RESPIRATION DEFICIENT
COMPRISE PROTEIN FREE POWDER MAINLY COMPRISE
PHOSPHOLIPID
PA - (TEIJ) TEIJIN LTD
PN - JP58164513 A 830929 DW8345 006pp
ORD - 1983-09-29
IC - A61K35/42 ; A61K37/22
FS - CPI
DC - B04
AB - J58164513 The surfactants (I) comprise protein-free
powders, 80% or more of which are phospholipids (II).
The major components of (II) should pref. be
phosphatidyl glycerol (IV). (III) should amount to
65-90 wt.% and (IV) 3-15 wt.% of the total
phospholipids. 65-90 wt.% of (III) should pref. be
phosphatidyl choline having two satd. fatty acid
(mainly consisting of palmitic acid) residues.
- Prepn. of (I) comprises dissolving pulmonary
surfactants obtd. by isolation and purificn. from the
lung tissue extracts or lung washing liquors of mammals
in phospholipid-dissolving organic solvents (pref.
chloroform, methylene chloride, carbon tetrachloride,
tetrahydrofuran and/or diethyl ether. The solns. obtd.
are contacted with adsorbents (pref. active carbon or
silica gel) to remove proteins. Then, organic solvents
(pref. acetone, ethyl acetate, methyl ethyl ketone
and/or benzene benzene) in which phospholipids are
insol or sparingly soluble so as to ppt pulmonary
surfactants contg. no proteins. Pptes. are separately
collected and dried.
- (I) have high surface activities. (I) are useful for
the treatment of infantile respiration deficiency
symptoms, etc. (O/C)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—164513

⑤ Int. Cl.³
A 61 K 35/42
37/22

識別記号

庁内整理番号
7138—4C
7138—4C

⑬ 公開 昭和58年(1983)9月29日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑭ 肺表面活性物質及びその調製法

日野市旭が丘4丁目3番2号帝
人株式会社生物医学研究所内

① 特 願 昭57—46404

② 発 明 者 小久保雅之

③ 出 願 昭57(1982)3月25日

日野市旭が丘4丁目3番2号帝
人株式会社生物医学研究所内

④ 発 明 者 吉田恒正

⑤ 出 願 人 帝人株式会社

日野市旭が丘4丁目3番2号帝
人株式会社生物医学研究所内

大阪市東区南本町1丁目11番地

⑥ 発 明 者 三浦祝爾

⑦ 代 理 人 弁理士 前田純博

明 細 書

1. 発明の名称

肺表面活性物質及びその調製法

2. 特許請求の範囲

1. 全体の80重量%以上がリン脂質からなり、実質的に蛋白質を含まない粉末状の肺表面活性物質。
2. リン脂質の主要成分がホスファチジルコリンとホスファチジルグリセロールであり、前者は全リン脂質の85～90重量%を占め、後者は8～18重量%を占める、特許請求の範囲第1項記載の肺表面活性物質。
3. ホスファチジルコリンの85～90重量%がパルミチン酸を主要成分とする飽和脂肪酸残基を2個有するホスファチジルコリンである、特許請求の範囲第1項記載の肺表面活性物質。
4. 哺乳動物の肺組織の抽出液あるいは肺洗滌液より分離、精製して得られる肺表面活性物質を、リン脂質可溶性の有機溶剤に溶解し、得られた溶液を吸着剤に接触させることにより蛋白質を吸着除去し、その吸着液にリン脂質不溶性又は難溶性の有機溶剤を添加混合して実質的に蛋白質を含まない肺表面活性物質を沈殿させ、該沈殿を分離し乾燥することからなる粉末状の肺表面活性物質の調製法。

質を、リン脂質可溶性の有機溶剤に溶解し、得られた溶液を吸着剤に接触させることにより蛋白質を吸着除去し、その吸着液にリン脂質不溶性又は難溶性の有機溶剤を添加混合して実質的に蛋白質を含まない肺表面活性物質を沈殿させ、該沈殿を分離し乾燥することからなる粉末状の肺表面活性物質の調製法。

5. 吸着剤が活性炭又はシリカゲルである、特許請求の範囲第4項記載の肺表面活性物質の調製法。
6. リン脂質可溶性の有機溶剤がクロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、アトラヒドロフラン、ジエチルエーテル又はこれらの混合物である、特許請求の範囲第4項記載の肺表面活性物質の調製法。
7. リン脂質不溶性又は難溶性の有機溶剤がアセトン、酢酸エーテル、メチルエチルケトン、ベンゼン又はこれらの混合物である、特許請求の範囲第4項記載の肺表面活性物質の調製法。

3 発明の詳細な説明

本発明は動物由来（ヒトを除く）の蛋白質を實質的に含まない肺表面活性物質及びその調製法に関する。

動物の肺胞には、肺表面活性物質と称するリン脂質を主成分とする生理活性物質が存在する。これは肺胞の内壁を覆い、肺胞上皮保護作用を有すると共に、動物が呼吸機能を維持する上に重要な生理的機能を示している。即ち、肺表面活性物質は、呼吸時、吸気時における肺胞内面の表面張力を変化させると云つた特異な表面活性を有しており、肺胞相互間の安定性に寄与して、抗無呼吸作用を示すと云われている。肺表面活性物質については、従来種々の動物について多くの研究がなされ、その全態が明らかにされつつある。即ち、この活性物質は、その成分としてリン脂質、中性脂質、蛋白質等を含み、主成分はリン脂質の一つであるジペルミトイルレシチンであることが知られている。

最近、藤原らは牛肺より抽出した活性物質に、

788~795, 1973; Fed. Proc., 33, 2238~2241, 1974)。

これは分子量が38,000で、疎水性のアニオン性を多量に含む脂溶性蛋白質であることが知られている。このような事実からして、上記の如く、天然の肺表面活性物質からFolchの方法により有機溶剤可溶部を抽出することにより肺表面活性物質を調製することは、必要なリン脂質、中性脂質等のみならず肺固有の蛋白質も抽出され、その混入は避けられないと考えられる。そして動物由来の蛋白質の混入は、抗原性を発現し、アナフラキシー等の副作用が惹起される可能性があり、肺表面活性物質の医薬品化を考えた場合、これらは好ましくない。

実験、後述の参考例に示す如く、哺乳動物の肺より分離した肺表面活性物質からFolchの方法により抽出・精製された脂質部には、2~3%の動物由来の蛋白質が混入していた。

本発明者らは、高い表面活性を有する肺表面活性物質を得るべく、出来るだけ天然の肺表面

ジペルミトイルレシチン を添加して、人工的により活性の高い肺表面活性物質を得、これを用いて新生児呼吸窮迫症候群（IRDS）に経気道的に補充療法を行つて良好な結果を得たことを報告している（小児科臨床、第32巻、第7号、第1343頁）。また、小林らは豚の肺洗浄液より活性物質を分離、更に活性を高める為に Ca^{++} を共存させた肺表面活性物質を調製し、IRDSの補充療法を行い成功している（日本界面医学会雑誌、第12巻、第1号（1981））。

これらの方法においては天然の肺表面活性物質からFolchの方法、即ちクロロホルム-メタノール場合溶剤等では有機溶剤可溶部を抽出する方法により脂質部を抽出して、牛や豚に由来する異種蛋白質を除去しているものゝ、その除去は完全ではなく、1~5%前後の異種蛋白質の混入が認められている。また天然より得られた肺表面活性物質の中には、通常の血清蛋白とは異なる肺固有の蛋白質の存在がKingらによつても認められている（Kingら、Am. J. Physiol., 234,

活性物質に近い組成を基本組成とした。しかも異種蛋白質を實質的に含まない肺表面活性物質に關し鋭意研究を行なつた。その結果、動物由来の蛋白質の選択的除去は活性炭等の吸着剤による処理によつて行なうことができるが、かかる処理によつて表面活性の低下が認められる場合もあり、必ずしも高活性のものが得られないということが判明した。本発明者らは更に検討を続けた結果、前述の如くして得られた實質的に蛋白質を含まない肺表面活性物質から、中性脂質とコレステロールを除去ないし減少させれば肺表面活性物質は粉末化できること、そしてこの粉末状のものは、天然のものあるいは更にFolchの方法で抽出・精製されただけのものとほぼ同等の高い表面活性を有することを知見し本発明に到達した。

即ち、本発明は、全体の80重量%以上がリン脂質からなり、實質的に蛋白質を含まない粉末状の表面活性物質である。そして、かかる粉末状の肺表面活性物質は、哺乳動物の肺組織

の抽出液あるいは肺洗淨液より分離・精製して得られる肺表面活性物質を、リン脂質可溶性の有機溶剤に溶解し、得られた溶液を吸着剤に接触させることにより蛋白質を吸着除去し、その後、この溶液にリン脂質不溶性又は難溶性の有機溶剤を添加混合して実質的に蛋白質を含まない肺表面活性物質を沈殿させ、この沈殿を分離し乾燥することによつて調製することができる。

本発明において哺乳動物の肺組織の抽出液あるいは肺洗淨液より分離・精製して得られる肺表面活性物質とは、牛、馬、豚、羊等の肺組織の抽出液あるいは肺洗淨液から、例えば、遠心分離等の方法で分離・精製されるいわゆる天然の肺表面活性物質、あるいはこの天然の肺表面活性物質を、例えば、Folchの方法で更に抽出・精製して得られるより蛋白質含量の少ない脂質部等を意味する。

本発明においては、前記の如き肺表面活性物質を、例えば、クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、テトラヒドロフラン、ジエチルエ

ーアル等のリン脂質可溶性の有機溶剤に、好ましくは濃度が1～10% (W/V) となる様に溶解する。そして、得られた溶液に活性炭やシリカゲル等の吸着剤を添加し、好ましくは0～30℃で10分～3時間攪拌し、その後、蛋白質を吸着した吸着剤を尹過等により除く。用いる吸着剤の量はリン脂質に対し1.0.0～4.0.0重量%が適当である。

得られた尹液あるいは濃縮した尹液に、酢酸エチルやアセトン等のリン脂質不溶性又は難溶性の有機溶剤を添加混合し、実質的に蛋白質を含まない肺表面活性物質を沈殿させる。必要に応じてこれらの操作は繰り返してもよい。場合によつては、尹液を蒸発乾燥し、固形状の肺表面活性物質を得、更にこれをクロロホルム、塩化メチレン等の有機溶剤に溶かし直してから前記の沈殿操作を行なつてもよい。かかる沈殿操作によつて、肺表面活性物質中の中性脂質とコレステロールは除去ないし減少せられる。この中性脂質とコレステロールを除去ないし減少

させる操作の後に、前述の蛋白質を吸着除去する操作を行なつても本発明の目的は達成することができる。

次に、沈殿は尹過あるいは遠心分離等で分離し、その後、例えば減圧下に乾燥され、粉末状の肺表面活性物質となる。かくして得られた肺表面活性物質は、その8.0重量%以上がリン脂質からなり、蛋白質の含量は0.5重量%以下である。リン脂質の主要成分はホスファチジルコリンとホスファジリグリセロールであり、前者は全リン脂質の6.5～9.0重量%を占め、後者は3～1.5重量%を占めている。ホスファチジルコリンの6.5～9.0重量%がパルミチン酸を主要成分とする飽和脂肪酸残基を2個有するホスファチジルコリンである。中性脂質は5重量%以下で、コレステロールはほとんど含まれていない。

本発明の肺表面活性物質の表面活性は後述の改良型ウィルヘルミーバランスで測定すると、第1図に示すような肺表面活性物質の典型的なヒ

スタリレスループを描き、最小表面張力は1.0 dyne/cm以下、最大表面張力は4.5～6.0 dyne/cmであつた。安定性の指標であるスタビリティインデックスは1.2以上であつた。

本発明の肺表面活性物質は粉末状であるので、そのまま粉末剤として吸入等の方法により、呼吸窮迫症候群等の治療に使用することができる。また、表面活性に障害にならない医学的に許容される粉末状物質、例えばアミノ酸や糖を、賦形剤あるいは保存剤として使用することもできる。

以下、参考例及び実施例により本発明を詳述する。なお、本発明において、各種の分析・測定は以下の如き方法で行なつたものである。

リン脂質は、Bartlett法でリン含量を求め、リン脂質成分の分子量を主成分のホスファチジルコリンジパルミトイルのそれで代表し、得られたリン含量の値に734/31を乗じたものをリン脂質含量とした。中性脂質、総コレステロール、炭水化物は標準との反応を利用した日立

705 型自動分析装置で分析し、算出した。蛋白質の測定はLowry法に準じた方法により行い、牛血清、アルブミンによる検量線にて算出値は有無の検出を行つた。リン脂質の各成分は、常法によりシリカゲルの二次元薄層クロマトグラフィにより各成分を分離し、次に分離された各スポットを分離、抽出してBarillet法でリンを定量し、前記の方法で算出した。

肺表面活性物質の表面張力の測定とスタビリティインデックスの算出は以下の如き方法で行なつた。

測定にはアコマ社製のウィルヘルミー・バランスを使用し、このテフロン水槽に生理食塩水を50 ml入れ、その上に粉末上の被検試料或いは分散液状の被検試料の微量を静かにのせた。そして、0.3サイクル/分の速度で液体の表面張力を40 dyneから13 dyneの間で連続的にサイタリングさせ、X-Yレコーダで第1図に示した如き表面張力-表面張力ダイアグラムを記録した。サイタリング開始後5〜6回目で一定に収束した

ヒステリシスループから最小表面張力(r_{min})の値と最大表面張力(r_{max})の値及び安定性の指標であるスタビリティ・インデックス(S.I.)を下式から求めた。

$$S.I. = \frac{2(r_{max} - r_{min})}{r_{max} + r_{min}}$$

参考例及び実施例中の%はすべて重量基準である。

参考例

M.E.Abramsの方法(J.Appl.Physiol. 21, 718-720)に基づき、下記に示す方法で肺表面活性物質を分離した。即ち、牛の肺臓2kgを細切し、生理食塩水8 lを用いてホモジナイザーでホモジナイズし、ガーゼにて濾過して抽出液を得た。次に1000 rpm × 30分の低速遠心分離で行ない上清をとり、得られた上清を7000 rpmの高速回転で1時間遠心分離し、沈澱を得た。予め冷却調製した飽和食塩水(比重1.21)に沈澱を分散し、7000 rpm × 20

分間の遠心分離を行い、上層の白い薄層を分離した。この白い薄層部を冷却蒸留水で透析し、凍結乾燥を行うことにより天然の肺表面活性物質を得た。

次にPolchの方法に準じて、クロロホルム/メタノール(2:1 v/v)混合溶媒に得られた天然の肺表面活性物質を溶解し、0.5%の食塩水に接触静置することにより、脂質部を得た。この脂質部の表面活性及びLowry法による蛋白質含量の測定結果は第1表に示す如くであり、表面活性は高いが、約3%の蛋白が含有されていた。またこの脂質部をSDSで可溶化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を通常の方法で行つたところ、移動度0.73のところから単一バンドが認められた。これは脂質として同時に行つた免疫グロブリンのL鎖、H鎖の移動度より、分子量は約35,000と推定された。

実施例1

参考例と同様の方法で得られた肺表面活性物

質の脂質部(Polchの方法で精製したもの)(1.5%の蛋白を含む)1.0 gをクロロホルム50 mlに溶解した。これに粉末活性炭2.0 gを加え、室温、窒素雰囲気下で約30分攪拌し、活性炭を濾過により除去し、濾液をロータリーエバポレーターで窒素、減圧下に蒸発乾燥した。更に高真空下乾燥し、白黄色固形物700 mgを得た。このものの表面活性は第1表に示した。蛋白含量は測定限界の5 µg/ml以下であり実質的に含まれていなかった。

次に得られた固形物500 mgをクロロホルム2.5 mlに溶解し、これにアセトン12.5 mlを添加し、攪拌して白色沈澱を生成せしめ、3000 rpmで10分間の遠心分離を行ない白色沈澱物を得た。その後、2.5 mlのクロロホルムに溶解し、アセトン12.5 mlを添加することによる再沈沈操作3回繰返し行い、乾燥して白色粉末状物質250 mgを得た。このものの表面活性は第1表に示した如くであつた。SDS-ゲル電気泳動分析は、検体1.0%を含む10% SDS溶液

20 μ g をポリマクリルアミドゲルに重層することにより行つたが、ターマジーブリリアントブルーで染色の結果、何のバンドも認められなかった。また Lowry 法により蛋白含量を測定した結果測定限界の 5 μ g/ml 以下であつた。

第1表から明らかになく、除蛋白し更に粉末化したものは、除蛋白だけのものに比べ、最小表面張力が小さくなりかつスタビリティ・インデックスは高くなつており、表面活性が高くなっている。

なお、本実施例で得られた本発明の肺表面活性物質の組成は、以下の通りであつた。

含有成分	組成例
リン脂質	9.5
ホスファチジルコリン	7.5
ホスファチジルグリセロール	1.5
ホスファチジルエタノールアミン	7
その他のリン脂質	5
中性脂質	5
コレステロール	trace
その他	trace

豚の肺表面活性物質 (Folch の方法で精製したもの) の表面活性及び蛋白含量は第1表に示した如くであつた。この肺表面活性物質 1.0 g を 40 ml のクロロホルムに溶解した。なおこの不溶物は戸通により除いた。得られたクロロホルム溶液に活性炭 2.0 g を添加し、室温で3時間攪拌した。

戸通により活性炭除去後、クロロホルム留去により 2 ~ 3 ml に濃縮した。過剰の酢酸エチルエステルを添加し、白い沈殿物を得た。再度少量のクロロホルムに溶解し、酢酸エチルエステルにて沈殿させ乾燥して白色粉末状物質 400 mg を得た。

このものゝ表面活性は第1表に示した如く非常に高く、蛋白含量は 5 μ g/ml 以下であつた。

実施例 4

豚の摘出肺に生理食塩水を注入して、肺洗液 2 g を得た。500 rpm × 20 分間の低速遠心で細胞画分を除き、6,000 rpm × 1 時間で、白

また、本発明の肺表面活性物質の急性毒性試験を、6 週令の dd-系マウスの腹腔内投与で検討したが、所見では何人の異常も認められず、LD50 値は 3 g/kg 以上であつた。

実施例 2

豚の肺臓 1 kg より、実施例 1 と同様な方法で肺表面活性物質の脂質部 1.2 g を得た。このものを 5 ml のクロロホルムに溶解し、過剰アセトンを添加して白色沈殿物を得た。本操作を実施例 1 と同様 3 回行い、白色沈殿物を得た。次にこのもの 500 mg をクロロホルム 30 ml に溶解し、これに粉末状活性炭 1.0 g を加え、窒素雰囲気下で室温で 1 時間攪拌した。戸通により活性炭除去後、乾燥して白色粉末体 350 mg を得た。このものゝ表面活性は第1表に示した通りであり、蛋白含量は 5 μ g/ml 以下であつた。

実施例 3

参考例の方法に従つて牛肺組織より得た、天

黄色の沈澱物を得た。次に沈澱物を飽和食塩水に分散し、比重 1.17 の分散液を調製して、7,000 rpm × 1 時間の遠心分離を行つた。分離した上層の白色層を取り、過剰のアセトンに分散して、アセトン可溶部を除きクロロホルム-メタノール 2 対 1 の混合溶媒に溶かし、Folch らの方法に従じて、脂質部を 320 mg を得た。

得られた脂質部をクロロホルム 20 ml に溶解し、粉末活性炭 500 mg を添加、30 分攪拌した。戸通により活性炭除去後、乾燥して白黄色物 200 mg を得た。このものゝ表面活性は第1表に示した如くであり、蛋白含量は検出限界 5 μ g/ml であつた。

第 1 表

測定サンプル	測定時の形状	表面活性			蛋白含量 (%)
		最大表面張力 dyne/cm	最小表面張力 dyne/cm	スタビリティ インデックス	
参考例 (天然の肺表面活性物質の脂質部)	1%分散液	51	4	1.71	2.0
実施例1 (活性炭処理) (卵蛋白, 粉末化)	1%分散液	59	10	1.42	0
	粉末体	41	2	1.61	0
実施例2 (卵蛋白, 粉末化)	粉末体	43	3	1.74	0
実施例3 (天然の肺表面活性物質) (卵蛋白, 粉末化)	1%分散液	53	8	1.48	12.0
	粉末体	45	2	1.53	0
実施例4 (卵蛋白, 粉末化)	粉末体	42	2	1.52	0

4. 図面の簡単な説明

第1図は、肺表面活性物質の表面積-表面張力ダイアグラムを示す。

